

***Lactobacillus reuteri* som probiotisk terapi vid
bakteriell vaginit hos avelsråttor**

Johannes Bergstedt

Handledare: Karel Krovacek, PhD, avdelningen för bakteriologi,
Veterinärmedicinska fakulteten

Bitr. handledare: Professor Tore Midtvedt, avdelningen för Medicinsk Mikrobiell
Ekologi, KI

Examensarbete 2004:19
Veterinärprogrammet
Veterinärmedicinska fakulteten
SLU
ISSN 1650-7045
Uppsala 2004

Inledning	4
Probiotika	5
Lactobacillers probiotiska egenskaper	5
<i>Lactobacillus reuteri</i>	6
Taxonomi	6
Biokemiska egenskaper	6
Habitat och värdspektra	6
<i>L. reuteris</i> probiotiska egenskaper	7
Bakteriella vaginit	7
Probiotisk behandling av råttor på Scanbur	9
Bakgrund	9
Material och metoder	11
Resultat	12
In vitro försök med <i>Lactobacillus reuteri</i>	13
Material och metoder	14
Resultat	16
Diskussion	19
Sammanfattning	21
Conclusion	21
Referenser	23
Tack	24

Inledning

Patogena bakterier resistenta mot antibiotika är ett växande problem inom både veterinär och humanmedicin. All användning av antibiotika kan leda till resistensutveckling. För att begränsa utvecklingen av resistens är det viktigt att få ner den totala förbrukningen av antibiotika. Det finns inte någon säker metod för hur vi ska lyckas med det. Flera åtgärder måste vidtas som tillsammans kan leda till en betydande minskning av förbrukningen. Några sätt att få ner resistensutvecklingen är att använda antibiotika med så smalt spektrum som möjligt. Att använda rätt dosering, att endast använda antibiotika när det inte finns några andra alternativ och använda medel med kort eko-skugga (Midtvedt & Norin, 1997).

Probiotika är ett begrepp som ligger i tiden och som rätt använd kan ersätta en del behandlingar med antibiotika vid specifika infektioner. I detta EEF-arbete avser jag redovisa att probiotisk behandling med *Lactobacillus reuteri* kan vara ett alternativ vid behandling av avelsråttor med bakteriell vaginit orsakad av β -hemolyserande streptokocker grupp G. Dessutom redovisas resultat över *in vitro* försök av tillväxthämning och blockering av adhesion av *Streptococcus canis* genom *L. reuteri*

Probiotika

En direkt översättning av probiotika är ”för liv”. Det är ett vitt begrepp men inom medicinen är definitionen ungefär ”ett levande mikrobiellt kosttillskott som har en välgörande effekt på värdjuret genom att förbättra balansen hos dess tarmflora” (Fuller, R. 1992). Den grundläggande tanken är att de tillförda mikroberna ska återställa eller profylaktiskt stabilisera den mikrobiella balansen i kroppen och därmed hindra patogena mikrober att få fäste och skada. Oftast är det magtarmslemhinnan som är aktuell men principen gäller även för exempelvis mun- och vaginalslemhinnan.

Probiotika är inget nytt, tanken att lactobaciller skulle kunna motverka sjukdomar väcktes av Metchnikoff i början av 1900-talet (Metchnikoff, 1908). Det är dock under de sista 15-20 åren som forskningen kring probiotikan har intensifierats.

I de flesta fall är de ”probiotiska” mikroorganismerna mjölksyrebakterier men de är inte ensamma om att ha dessa egenskaper. Jästsvampen *Saccharomyces boulardii* har t.ex. visat sig ha en positiv effekt vid behandling av *Clostridium difficile* orsakad diarré. Lactobaciller har också visat sig ha positiv effekt vid ett flertal diarré-sjukdomar som t.ex. turistdiarré, akut infantil diarré hos människa (Elmer, 2001; Berger, 1998), *Cryptosporidium parvum*-inducerad diarré hos griskultingar och *Candida albicans* infektion hos möss (Casas & Dobrogosz, 2000).

En industri har på senare år vuxit upp kring mjölksyrebakteriernas ibland överdrivet positiva egenskaper. Det finns flera produkter för bl.a. kyckling-, kalkon- och grisuppfödare och i samband med fiskodling. På humansidan har ”functional foods” har blivit ett växande segment inom f.f.a. mejeriindustrin där antalet produkter ständigt ökar.

Lactobacillers probiotiska egenskaper

Lactobaciller kan verka på flera sätt, dels genom produktion av flera olika antimikrobiella ämnen och dels genom att blockera bindningsytor/receptorer och på det sättet förhindra kolonisering av patogena mikroorganismer.

Antimikrobiella ämnen

Laktat

Produktionen av laktat är en egenskap som alla lactobaciller har. Laktat sänker pH i den närliggande miljön vilket många patogena mikrober inte tål. Laktat har även en antimikrobiell effekt som kommer av själva molekylen. Den har visats kunna ta sig igenom bakteriens membran, frigöra vätejoner i cytoplasman och därmed störa vitala cellfunktioner (Axelsson 1990).

Produktion av andra slutprodukter

Väteperoxid kan bildas av alla lactobaciller och har en hämmande effekt. Det kan även reagera med thiocyanat. Intermediära produkter som då bildas bidrar till att försämra förutsättningarna för många patogena mikroorganismer (Axelsson 1990).

Vidare producerar samtliga lactobaciller diacetyl (en karakteristisk smördoft) vilket har dokumenterat antimikrobiell effekt (Axelsson 1990).

Vissa *Lactobacillus* arter kan dessutom producera specifika antibakteriella ämnen med låg molekylvikt. Reuterin och acidolin är två exempel från *L. reuteri* och *L. acidophilus* (Axelsson 1990).

Lactobacillus reuteri

Taxonomi

Genus *Lactobacillus* tillhör gruppen mjölksyrebakterier dit även genus *Enterococcus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus* och *Streptococcus* hör. Gemensamt för dessa är att de är icke sporulerande, Grampositiva, katalasnegativa och att de producerar mjölksyra från kolhydrater.

Biokemiska egenskaper

Genus *Lactobacillus* är G-positiva, oxidasnegativa stavar, fakultativt eller strikt anaeroba. Det finns ca 70 arter som kan delas upp i tre grupper:

- Obligat homofermentativa vilkas slutprodukt efter fermentationen av glukos via glykolys nästan uteslutande består av laktat. Till dessa hör t.ex. *L. acidophilus*.
- Obligat heterofermentativa som använder en annan väg, 6-fosfoglukonat/fosfoketolas, vid fermentationen av glukos och slutprodukterna blir laktat, etanol/acetat och koldioxid. Till dessa hör t.ex. *L. reuteri* och *L. fermentum*.
- Fakultativt heterofermentativa kan använda båda dessa vägar. *L. casei* tillhör denna grupp.

Habitat och värdspektra

Lactobacillus-arter trivs bäst i miljöer med rik tillgång på näringsämnen bestående av aminosyror, nukleosider, vitaminer och fermenterbara kolhydrater. Detta leder till att de främst kan hittas i miljöer som växtmaterial, mjölkprodukter, kött- och fiskprodukter. Lactobaciller hör också till normalfloran i magtarmkanalen och vagina hos människor och djur. Vissa arter kan man finna i nästan vilka av dessa

miljöer som helst medan andra arter har mer specifika krav för att trivas (Ström 2000; Molin et al, 1992).

L. reuteri finns framförallt i magtarmkanalen hos människa och djur. Vid en undersökning av tarmflora hos människa, svin, höna, nöt, hund, mus, råtta och hamster var *L. reuteri* den enda lactobacill som kunde isoleras från samtliga undersökta djurarter (Casas & Dobrogosz, 2000). Dessutom har *L. reuteri* isolerats från ett antal livsmedel som kött- och mjölkprodukter, surdeg och risnudlar.

***L. reuteri*s probiotiska egenskaper**

Reuterin

Reuterin är ett specifikt antimikrobiellt ämne som är unikt för *L. reuteri*. Det har visat sig ha effekt mot både Grampositiva och Gramnegativa bakterier, svampar och protozoer (Casas & Dobrogosz, 2000).

Användning av L. reuteri i djuruppfödning

L. reuteri har visat sig ha egenskaper användbara för djuruppfödning. I kalkon- och kycklingbesättningar med problem med hög dödlighet och dålig tillväxt har tillskott i fodret av *L. reuteri* visat sig sänka dödligheten och öka tillväxten. Hos kultingar har försök visat att *L. reuteri* har en profylaktisk verkan mot diarré orsakad av *Cryptosporidium parvum*. De kultingar som fått probiotikan hade lindrigare diarré med kortare sjukdomsperiod jämfört med kontrollerdjuren. Dessutom misstänks störning av tarmfloran med efterföljande avsaknad av *L. reuteri* ge vissa *E. coli*-stammar möjlighet att växa till och orsaka ödemsjuka hos svin (Aiello 1998).

Bakteriella vaginit

Normal vaginalflora

Den normala vaginalfloran hos människor och djur består till stor del av lactobaciller (Carter et al 1995, Reid & Bruce 2001). Vaginalfloran varierar bl.a. med djurets ålder och cykliska stadium. Lactobaciller ingår även tillammans med vissa koliformer, streptokocker och andra vanliga tarmbakterier i den normala tarmfloran. Dessa bakterier fungerar som ett skydd mot infektioner. De blockerar bindningsytor för patogena bakterier och producerar ett flertal antimikrobiella ämnen. Speciellt viktiga för skyddet av vaginalslemhinnan anses väteperoxidproducerande lactobaciller vara. (Reid & Bruce 2001)

Bakteriella vaginit

Uppkomsten av vaginit anses bero på att den skyddande bakteriefloras sammansättning ändras av någon anledning, exempelvis genom antibiotikabehandling, mekanisk skada eller annan förändring av slemhinnan. I

praktiken anses förlust av lactobaciller ge den största försämringen av försvaret. Patogener från exempelvis tarmfloran kan då växa till och orsaka en överväxt (Reid & Bruce 2001, 2003). Den konventionella behandlingen är antibiotikabehandling, helst efter provtagning och bakterieodling och resistensbestämning (Ettinger & Feldman 2000; Reid & Bruce 2001, 2003; Aiello 1998; Elmer 2001). Inom human medicin är ett gammalt råd att behandla lindrigare vaginiten med yoghurt lokalt. För att vetenskapligt bevisa att detta fungerar har en del *in vivo* försök gjorts med olika lactobacillusarter som givits både intravaginalt och oralt har gett lovande om än inte entydiga resultat, mer forskning behövs (Elmer 2001; Reid & Bruce 2001, 2003).

β-hemolyserande streptokocker grupp G

β-hemolyserande streptokocker grupp G är en del av normalfloran på hud, munhåla, tarm och genitalia hos människa och många andra djurslag. Hos hund är det den mest förekommande streptokocktypen som finns på hud och slemhinnor. Hos människa kan den i enstaka fall orsaka dermatit och pharyngit men har även isolerats från septikemier, endokarditer och peritoniter (Greene 1990). I denna grupp av β-hemolyserande streptokocker grupp G ingår bl.a. *Streptococcus canis* som kan orsaka vaginiten, aborter och sårinfektioner hos hund och katt (Greene 1990; Carter, Chengappa & Roberts 1995).



Bild 1. *S. canis* på blodagar.

Adhesion

Det inledande steget för uppkomst av bakteriell infektion hos en värd innebär bakteriell kolonisation. För att en bakterie ska kunna föröka sig och kolonisera en värd krävs att den har möjlighet att adherera till värdceller. Adhesion kan ske

direkt till cellens yta eller indirekt till ämnen utsöndrade från vävnaden, t.ex. mucin.

Speciella ytkomponenter hos bakterierna, ligander eller adhesiner, har förmågan att binda till receptorer på värdcellens yta. Adhesinerna kan finnas på bakteriens yttre membran, kapsel eller fimbrier. De flesta adhesiner består av glycoproteiner eller lipoproteiner. Värdcellernas receptorer består oftast av olika sockermolekyler. (Carter, Chengappa & Roberts 1995)

Probiotisk behandling av råttor på Scanbur

Bakgrund

Scanbur är ett företag bedriver kommersiell uppfödning av försöksdjur, i huvudsak råttor och möss. Vid Scanbur följer man Federation of European Laboratory Animal Science Association (FELASA) rekommendationer för hälsokontroll och enligt dessa får det inte finnas andra β -hemolyserande streptokocker än grupp D hos råttorna.

Ett forskarlag i Lund upptäckte våren 2002 en streptokockinfektion (β -hemolyserande grupp G) i vagina hos Sprague Dawley (SD)-råttor levererade från Scanbur. Smittan upptäcktes vid en hälsokontroll utförd vid Statens Veterinärmedicinska Anstalt (SVA) i Uppsala. Uppfödarens ordinarie hälsokontroller görs kvartalsvis på Public Health Laboratory i England. En extra hälsokontroll gjordes på fyra slumpvis utvalda åttaveckors SD honor som skickades till det vanliga labbet i England. Denna gång var alla fyra undersökta djur positiva för β -hemolyserande grupp G. Djurstallet med de aktuella djuren innehöll vid tillfället ca 3000 avelshonor och ca 100 avelshanar. Att ett positivt provresultat på svabbprov från inredning i djurstallet taget i november året innan, alltså ca sex månader innan smittan upptäcktes på djuren, tyder på att β -hemolyserande grupp G fanns i omgivningen.

Sprague Dawley (SD)

Rasen etablerades av Robert W. Dawley 1928. SD är en snabbväxande, utavlad albinoråtta som har snabb tillväxt och får stora kullar. Scanburs nuvarande stam etablerades 1991. SD finns hos flera uppfödare men då stammarna hålls åtskilda utvecklas över tiden små skillnader mellan stammarna.

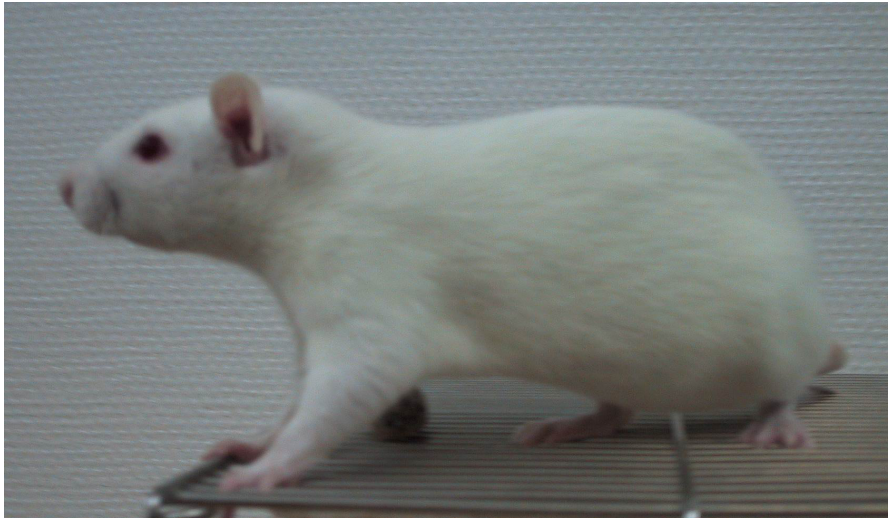


Bild 2. Sprague-Dawley hona

Spridning av smittan

Smittan hos djuren hade antagligen spridits vid brunstkontroll av djuren. Vid detta arbetsmoment förs en probe in i vaginan för att kontrollera om honan är brunstig. Denna probe skulle enligt avdelningens Standard Operating Procedures (SOP) rengöras med 70 % M-sprit efter mätning av 200 djur. Hur smittan kommit in i besättningen är okänt.

Impedans-mätare

Det finns flera sätt att kontrollera om råttor är i brunst. Ett av de vanligaste är vaginalcytologi. Det är ett säkert sätt men det kräver en hel del arbete och tid då flera arbetsmoment ingår. Vaginalsekret från en råtta måste strykas på ett objektglas, torkas, färgas och sedan analyseras. I ett djurstall med över tusen avelshonor skulle det ta alldeles för mycket tid. Mätning av det elektriska motståndet (impedans) i vaginan är därför ett tilltalande alternativ. Impedansen varierar under östralcykeln och är hos råttor som högst vid proöstrus. Vid mätningen förs en probe in i vaginan. Proben är kopplad till ett instrument som visar motståndet i siffror. Är motståndet högt, mätt i K-ohm och värdet varierar något beroende på fabrikat, är råttan i proöstrus och redo för parning (Ramos, Lee & Peuler 2001).

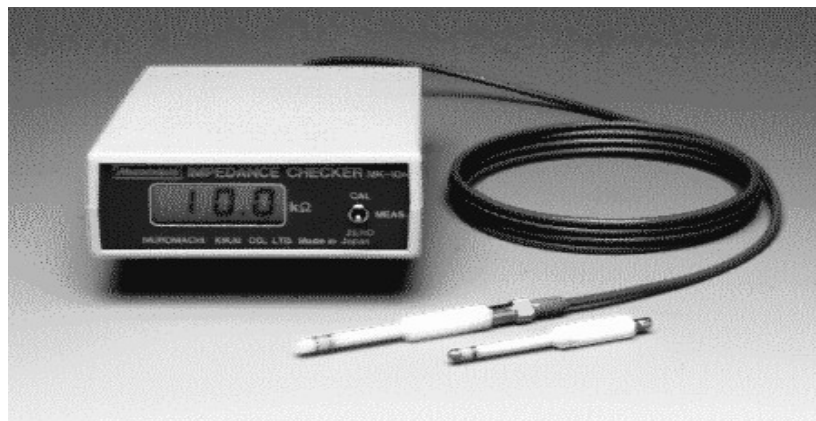


Bild 3. Kommersiell impedansmätare.

Åtgärdsalternativ

Det fanns flera alternativ för att bli av med smittan.

- Slå ut alla djur och börja om på nytt till en stor kostnad ekonomiskt och tidsmässigt.
- Antibiotikabehandling. Då det är känt att antibiotika förändrar den bakteriella normalfloran ville man undvika att använda denna metod i det längsta.
- Probiotisk behandling.

Material och metoder

*Odling av *L. reuteri* för behandling av avelsråttor*

L. reuteri WS 2010 (Biogaia, Lund) odlades i DE MAN, ROGOSA und SHARPE (MRS)-buljong på avdelningen med gnotobiotiska försöksdjur, Karolinska Institutet, Stockholm.

*Dricksvattenlösning innehållande *L. reuteri**

0,1 ml bakteriesuspension innehållande ca 10^9 CFU/ml av *L.reuteri* inokulerades till 8 ml av MRS-buljong som inkuberades vid 37 °C i 3-4 dygn. 8 ml av denna bakteriesuspension tillsattes till 1000 ml av ny MRS-buljong och inkuberades i 24 timmar vid 37 °C. Denna bakteriesuspension (1000 ml) blandades med 100 liter dricksvatten vilket gav en slutlig koncentration av ca 10^7 CFU/ml. Från vattenbehållaren pumpades vattnet/bakterieblandning via ledningar till det ordinarie bevattningssystemet. Råttorna fick dricka obegränsad mängd. En råtta dricker ca 10 % av sin kroppsvikt varje dag vilket gör att det i djurstallet som innehöll ca 3000 avelshonor med ungar gick åt ca 100 l bakterieblandat vatten per dag.

Bakterielösning för intravaginal behandling

0,1 ml bakteriesuspension ca 10^9 CFU/ml av *L.reuteri* tillsattes till 10 ml MRS buljong och inkuberades 1 dygn vid 37 °C innan den transporterades till uppfödaren. Mängden bakterier i den färdiga lösningen var ca 10^9 CFU/ml.

Behandling av avelsråttor

Första behandlingen utfördes 020430. Alla avelshonor och avelshanar i det smittade stallet behandlades lokalt, honor i vagina och hanar under förhuden, med en bomullstops doppad i bakterielösningen. En ny tops för varje djur. Denna behandling upprepades efter fyra veckor.

Provtagningar för bakteriologisk undersökning

För provtagning användes transportwabs (116c med AMIES W/CH medium från COPAN Innovation). Med de medföljande topsen togs vaginalsekret från slumpvis utvalda 20 råttor. Proverna skickades till Laboratorium för Klinisk Mikrobiologi i Oslo för bakteriologisk analys. Topsen med vaginalsekret ströks på blodagar (humanerythrocyter) och plattorna inkuberades vid 37 °C aerobt i 24-48 timmar. Kolonier med β -hemolys isolerades och typades serologiskt för att påvisa streptokocker grupp G. Efter behandlingarna togs nya bakterieprover för analys.

Ändring av rutiner vid brunstkontroll

För att minska smittspridningen infördes nya rutiner för rengöring av proven vid brunstkontroll. Enligt de nya rutinerna ska proven efter användning på varje enskilt djur torkas av med en ren, torr bomullstrasa. Proben rengörs i 70 % etanol en gång per månad.

Resultat

Efter den första behandlingen påvisades β -hemolyserande streptokocker grupp D hos 3 av de 20 undersökta råttorna. β -hemolyserande streptokocker grupp G påvisades hos 1 djur.

Efter den andra behandlingen togs nya prov från 20 råttor. Hos dessa påvisades β -hemolyserande streptokocker grupp D hos 1 djur. Inga β -hemolyserande streptokocker grupp G påvisades.

Efter sista behandlingen med probiotika har fyra ordinarie hälsokontroller gjorts enligt gällande rutiner. Från samtliga kontroller har β -hemolyserande streptokocker grupp G ej kunnat påvisas.

Tabell 1. *Vaginalprover tagna mellan och efter behandlingsomgångarna*

provtagningsdatum	Antal djur	β -hem grp G	β -hem grp D
020621	20	1	3
020831	20	0	1

In vitro försök med *Lactobacillus reuteri*

För att verifiera effekten i *in vivo* försöket att *L. reuteri* är verksamt mot β -hemolyserande streptokocker grupp G utförde jag en rad laboratorieexperiment *in vitro*. *L. reuteris* probiotiska egenskaper testades med avseende på tillväxthämning och adhesionsblockerande funktioner mot β -hemolyserande streptokocker grupp G. Försöken utfördes med mindre modifikationer enligt Osset et. al., 2001.

Försök A – Inhibering av bakterieväxt i flytande medium.

För att studera effekten *L. reuteris* tillväxthämmande produkter mot *Str. canis* används sterilt bakteriekulturfiltrat från *L. reuteri*. Vilken substans som eventuellt har tillväxthämmande verkan har ej undersökts vid detta försök.

Försök B – Inhibering av bakterieväxt på fast medium.

Samma princip som försök A men utförs på blodagar (5% nöteryocyter).

Försök C – Inhibering av bakterieväxt på fast medium.

Samma princip som försök B men utförs med levande *L. reuteri*. Istället för bakteriekulturfiltrat.

Försök D – Adhesion till celler in vitro.

För att studera *L. reuteris* och *Str. canis* förmåga att binda till humana intestinalceller typ 407 *in vitro*.

Försök E – L. reuteris blockerande förmåga.

För att studera *L. reuteris* förmåga till blockering av adhesiva receptorer och på så sätt förhindra vidhäftning av *Str. canis*.

Försök F – L. reuteris förmåga att konkurrera med Str. canis om adhesionsplatser.

Variant av försök E. Att studera om det är någon skillnad om *L. reuteri* och *Str. canis* måste konkurrera om receptorer.

Försök G – L. reuteris bortstötande förmåga.

Att studera om *L. reuteri* har förmågan att stöta bort *Str. canis* som redan har adhererat.

Material och metoder

Odling av bakterier för in vitro försök

Samma *L. reuteri*-stam WS 2010 som använts i behandlingsförsöket har också använts vid detta *in vitro* experiment. Då det ursprungliga isolatet av den ursprungliga β -hemolyserande streptokock grupp G ej fanns tillgänglig så användes ett annat isolat β -hemolyserande streptokock grupp G, nämligen *Str. canis*. *L. reuteri* odlades i MRS-buljong medan *Str. canis* odlades i Todd-Hewitt buljong.

Adhesionsförsök

Vid adhesionsförsöken användes humana intestinalceller av typen INT-407 (Homo sapiens Intestine 407).

CFU

L. reuteri och *Str. canis* ströks på blodagar och inkuberades under 24 timmar i 37 °C i mikroaerofil miljö. Med en 10 μ l ögla, ”loopfull”, bakterier inokulerades 100 ml av respektive medium som inkuberades enligt ovan. Respektive bakteriesuspension späddes i en tiofaldig spädningsserie. 0,1 ml från varje spädningsrör raklades ut på blodagar som inkuberades. Resultat: *Str. canis* ca 6×10^8 cfu/ml, *L. reuteri* ca 5×10^8 cfu/ml.

Försök A – Inhibering av bakterieväxt i flytande medium.

Todd-Hewitt buljong med *Str. canis* och MRS buljong med *L. reuteri* odlades enligt tidigare beskrivning.

Str. canis suspension späddes till en koncentration av 6×10^4 CFU/ml. 1 ml av denna bakteriesuspension tillsattes till 3 ml Todd-Hewitt buljong.

L. reuteri suspension centrifugerades i 5000 v/min och supernatanten sterilfiltrerades genom ett Millipor 0,22 μ m filter och 1 ml av kultur filtratet

blandades med 1 ml utspädd *Str. canis* bakteriesuspension och 3 ml Todd-Hewitt buljong.

Två olika kontrollgrupper användes: i) 1 ml av ej inokulerad, sterilfiltrerad MRS buljong. ii) 1ml sterilt NaCl.

Dessa rör inkuberades i 24 timmar i 37 °C i mikroaerofil miljö. Resultaten av hämningsförsöket utvärderades genom spektrofotometri (OD 600 nm), bestämning av CFU och genom att visuellt jämföra eventuella skillnader i bakterie pelletsstorlek.

Försök B – Inhibering av bakterieväxt på fast medium med steril supernatant.

Str. canis bakteriesuspension odlad enligt tidigare beskrivning späddes till en koncentration av ca 6×10^6 CFU/ml. 2 ml av denna lösning hölls på blodagar, överskottet hölls av och ytan fick torka. Fyra brunnar (ca 5mm i diameter) stämplades ur agarn med hjälp av bakändan av en steril pasteurpipett.

Sterilt kulturfiltrat från *L. reuteri* bakteriesuspension och kontroll framställdes enligt procedur i försök A. 10 µl av kulturfiltratet respektive kontroll tillsattes i brunnar.

Plattorna inkuberades i 24 timmar 37 °C, mikroaerofil miljö. Plattorna avlästes okulärt under mikroskop för att bedöma eventuell hämning av bakterieväxt.

Försök C – Inhibering av bakterieväxt på fast medium.

2 ml av bakteriesuspension med ca 6×10^6 cfu/ml *Str. canis* spreds över blodagar på samma sätt som i försök B.

10 µl av *L. reuteri* bakteriesuspension, ca 5×10^8 CFU/ml applicerades på blodagarn och fick torka in. Som kontroll användes 10 µl av steril MRS buljong. Plattan inkuberades i 24 timmar i 37 °C i mikroaerofil miljö och lästes sedan av okulärt under mikroskop för att bedöma eventuell hämning av bakterieväxt.

Försök D – Adhesion till celler in vitro.

Adhesionsförsök utfördes enligt Krovacek (1996). INT-407 odlades på objektsglas under 48 timmar, 37 °C i CO₂ inkubator.

Flera olika koncentrationer av bakterier användes: i) i första försöket 15 ml sterilt fysiologiskt NaCl med totalt 12×10^8 CFU *Str. canis* och 15 ml sterilt fysiologiskt NaCl med totalt 1×10^8 CFU *L. reuteri*. ii) i andra försöket 12 ml sterilt fysiologiskt NaCl med 6×10^8 CFU/ml *Str. canis* och 12 ml sterilt fysiologiskt NaCl med 5×10^7 CFU/ml *L. reuteri*.

Bakteriesuspensionerna tillfördes till petriskålar där objektsglas med utvuxna INT-407 hade placerats och inkuberades på skakbord i 37 °C i 2 timmar i aerob miljö.

Efter inkuberingen tvättades objektglasen 4 gånger med sterilt fysiologiskt NaCl för att skölja bort icke adhererade bakterier. Därefter fixerades objektglasen med metanol och färgades de med kristallviolett.

Objektglasen studerades i mikroskop. För beräkning av adhererade bakterier räknades 30 celler med adhererade bakterier och antalet bakterier som fäste till dessa celler.

Försök E – L. reuteris blockerande förmåga.

Objektglasen preparerades som i försök D. 12 ml steril fysiologisk NaCl med 5×10^7 cfu/ml *L. reuteri* tillfördes till objektglas med utvuxna INT-407 celler och inkuberades på skakbord i 37 °C i 2 timmar, aerob miljö. Därefter tillfördes 12 ml steril fysiologisk NaCl med 6×10^8 cfu/ml *Str. canis* och objektglasen inkuberades i ytterligare 2 timmar. Objektglasen tvättades och fixerades som tidigare.

Försök F – L. reuteris förmåga att konkurrera med Str. canis om adhesionsplatser.

Objektglasen preparerades som i försök D. 12 ml steril fysiologisk NaCl med 6×10^8 cfu/ml *Str. canis* och 12 ml steril fysiologisk NaCl med 5×10^7 cfu/ml *L. reuteri* tillfördes till objektglas med utvuxna INT-407 celler och inkuberades i 2 timmar. Objektglasen tvättades och fixerades som tidigare.

Försök G – L. reuteris bortstötande förmåga.

Objektglasen preparerades som i försök D. 12 ml steril fysiologisk NaCl med 6×10^8 cfu/ml *Str. canis* tillfördes till objektglas med utvuxna INT-407 celler och inkuberades i 2 timmar. Därefter tillfördes 12 ml steril fysiologisk NaCl med 5×10^7 cfu/ml *L. reuteri*. Objektglasen tvättades och fixerades som tidigare.

Resultat

Försök A – Inhibering av bakterieväxt i flytande medium.

Tydlig skillnad av bakterieväxt i rören kunde ses (bild 4). I rören med kulturfiltrat från lactobaciller var pelleten bestående av streptokocker markant mindre än i kontrollrören. Mellan de båda kontrollgrupperna observerades ingen skillnad. Samma resultat observerades vid upprepade försökstillfällen. Vid mätning med hjälp av spektrofotometer jämfördes endast gruppen med kulturfiltrat och kontrollgruppen med steril MRS buljong. Resultaten visade statistiskt signifikanta skillnader mellan grupperna (tabell 2).

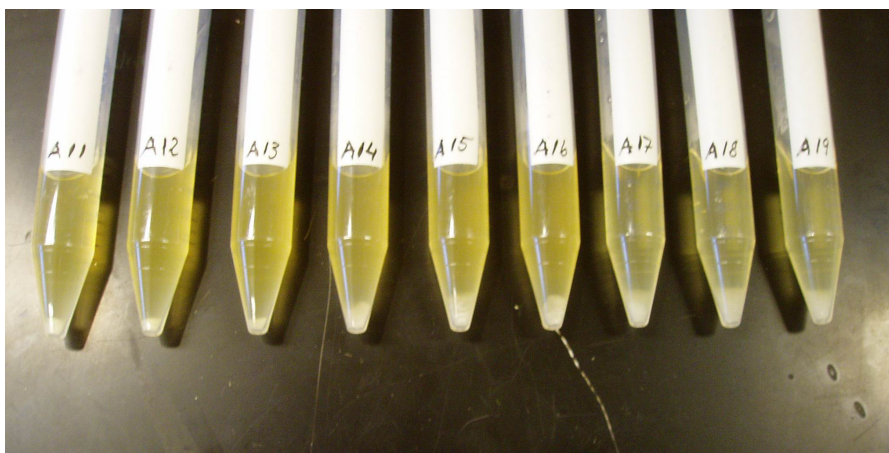


Bild 4. Rör A11-A13 med *L. reuteri* filtrat, rör A14-A16 kontroller med steril MRS-buljong, rör A17-A19 kontroller med sterilt fysiologisk NaCl.

Tabell 2. ¹Rör A5-A7 med *L. reuteri* filtrat, rör A8-A10 kontroller med steril MRS-buljong. ²Absorbans vid 600 nm våglängd, steril lösning av båda mediumtyperna och NaCl som bakgrund. ³Växt i flytande medium genom okulär bedömning av bottenpellets, +=sparsam växt, ++=måttlig växt, +++= kraftig växt. ⁴CFU/ml $\times 10^6$ vid ytspridning på blodagar.

Rör ¹	Absorbans ²	Växt flytande medium ³	CFU/ml ⁴
A5	0,0936	+	5
A6	0,0714	+	14
A7	0,0688	+	4
A8	0,8571	+++	23
A9	0,4351	+++	4
A10	0,8193	+++	3

Försök B – Inhibering av växt på fast medium.

En viss tendens till hämning kunde ses runt brunnarna med kulturfiltrat från *L. reuteri* men skillnaden mot kontrollbrunnarna ansågs för liten för att jag med säkerhet kan fastställa att hämning av bakterieväxt skett.

Försök C – Inhibering av växt på fast medium.

Även i detta försök ansågs skillnaden mot kontroll för liten för att hämning av bakterieväxt kan fastställas.

Försök D – Adhesion till celler in vitro.

Adhesion av *L. reuteri* till INT-407 kunde ses vid båda försöken med de olika bakteriekoncentrationerna (bild). Dock adhererade fler bakterier vid den lägre bakteriekoncentrationen (tabell 4).

Ingen adhesion av *Str. canis* till INT-407 kunde påvisas. (bild)

Tabell 3. Adesion av *L. reuteri* till INT-407. ¹Prov 8 och 9 fick den lägre bakteriekoncentrationen, prov 10-12 fick den högre bakteriekoncentrationen. ²Antal adhererade *L.reuteri* per INT-407, 30 celler per prov räknades.

Prov ¹	Antal bakt/cell ²
8	3,0
9	3,2
10	1,4
11	1,4
12	1,5

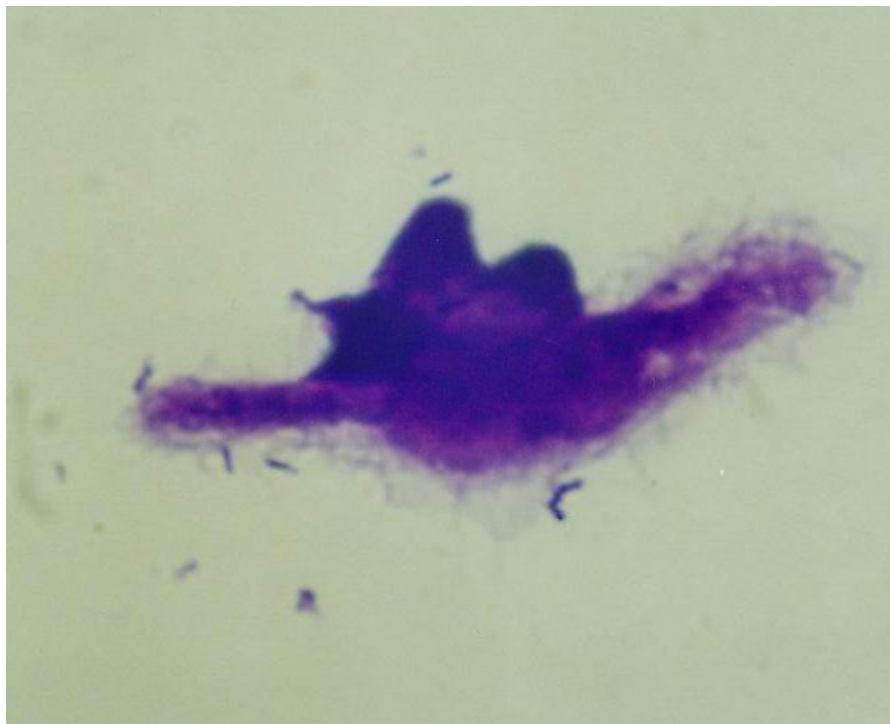


Bild 5. Flertal *L. reuteri* adhererade till INT-407

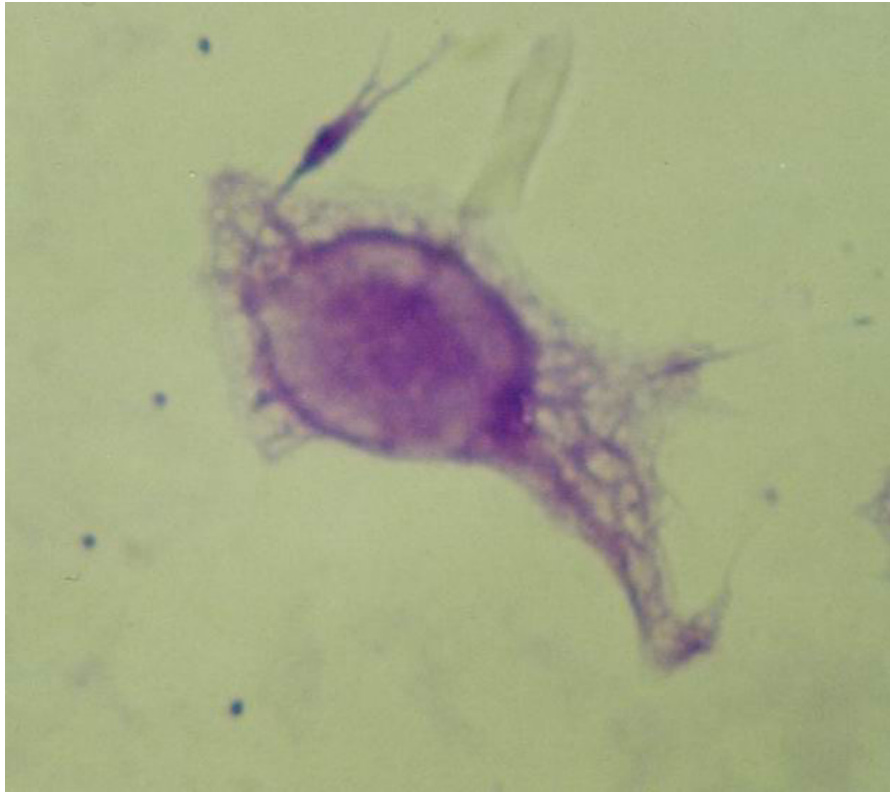


Bild 6. INT-407 utan adhererade *Str. canis*. Fyra bakterier kan ses i bakgrunden.

Försök E, F och G – L. reuteris blockerande förmåga– L. reuteris förmåga att konkurrera med Str. canis om adhesionsplatser och L. reuteris bortstötande förmåga.

Då *S. canis* ej adhererade till humana intestinala celler INT-407 kan inga slutsatser dras av dessa försök.

Diskussion

Probiotika är ett begrepp som ligger i tiden och som rätt använd kan ersätta eller i alla fall fungera som ett komplement till en del behandlingar med antibiotika vid olika specifika infektioner både hos djur och människa.

Streptokocksmittan hade funnits i besättningen hos Scanbur i flera månader och det är troligt att den var väl spridd bland djuren. Sedan den probiotiska

behandlingen av avelsråttorna har avslutats, vilket nu är över ett år sedan, har ingen ny smitta med β -hemolyserande streptokocker grupp G kunnat påvisas vid hälsokontrollerna. Det är troligt att den probiotiska behandlingen med *L. reuteri* har varit verksam.

Det är viktigt att påpeka att behandlingen av avelsråttorna inte var upplagt som ett vetenskapligt försök. Upplägget kom till under pressade förhållanden både tidsmässigt och ekonomiskt. Hade det kunnat utföras under normala förhållanden hade det planerats annorlunda med noggrannare provtagningar, kontrollgrupper för obehandlade djur och de olika administrationssätten. Självklart hade säkrare slutsatser kunnat dras av ett sådant försök.

I ett vidare perspektiv bör även andra saker belysas av detta arbete. Vikten av bra arbetsrutiner och hygien och även att identifiera den bakomliggande orsaken till problemen. Utan detta hade behandlingen varit meningslös. Smittan hade antagligen kommit tillbaka förr eller senare oavsett om alla djur slagits ut eller om de behandlats med antibiotika eller probiotika. I detta fall var boven i dramat impedansmätningen eller mer korrekt rengöringen av proben. En prob som rengörs efter vart två hundra djur är en mycket effektiv smittspridare! Hur streptokockerna kommit in till besättningen från första början kan man endast spekulera om. Det är väl känt att β -hemolyserande streptokocker grupp G finns som normalflora både hos människa och hos djur. Man kan spekulera kring om bristande handhygien hos någon försöksdjurstekniker/djurvårdare kan vara orsaken till att smittan kom in i besättningen.

Resultaten ifrån *in vitro* försöket visar att *L. reuteri* har förmåga att inhibera växt av *Str. canis*. Att det inte var någon skillnad mellan resultaten från CFU och absorptions är märkligt. En möjlig förklaring kan vara att proven med mycket växt även innehåller en stor del döda bakterier. De kan förslagsvis ha dött av näringsbrist p.g.a. det blivit för hög bakteriekoncentration i röret. En annan förklaring kan vara streptokockernas benägenhet till att aggregera i samband med växt. På så vis kan flera bakterier bilda en CFU. Vid en högre koncentration borde fler bakterier aggregera och på så vis ge ett missvisande resultat vid CFU bestämning. Hämningsförsöken på fast medium hade inte samma tydliga resultat. Troligtvis var testerna inte optimalt utformade utan skulle behöva vidareutvecklas. Till exempel kan koncentrationen av de eventuellt hämmande substanser ökas för att ge ett tydligare svar.

Adhesion till värdceller är ett första steg vid bakteriella infektioner. Att humana intestinalceller typ 407 valdes som modell i adhesionsförsöken hade flera orsaker. Den fanns tillgänglig på avdelningen för bakteriologi vid Veterinärmedicinska fakulteten, det är en väl beprövad cellinje för adhesionsförsök *in vitro*. Dessutom finns det vissa likheter i tarm- och vaginalfloran (Reid & Bruce, 2001). I mitt experiment hade *L. reuteri* förmågan att adherera till INT-407 medan *Str. canis* inte visade några tecken på att binda till INT-407. Det skulle vara intressant och mera relevant att göra om adhesionsförsöken men då med vaginalceller från avelsråttor. P.g.a. att *Str. canis* inte adhererade till INT-407 kan inga slutsatser dras om *L. reuteri* egenskaper som blockad mot adhesion.

I detta EEF-arbete har jag försökt belysa att probiotika kan vara ett behandlingsalternativ mot vaginit hos avelsråttor under vissa omständigheter. Det kan vara om djuren som i detta fall inte var kliniskt sjuka eller har milda symptom. Självklart måste annan behandling eller kombination av olika behandlingar sättas in om djuren är svårt sjuka och kan antas lida. Ytterligare forskning behövs kring probiotikans verkningsmekanismer och jag anser att användning av probiotika är ett intressant alternativ till viss antibiotikabehandling. Det är inte lösningen på alla problem med bakteriers antibiotikaresistensutveckling och kan inte ersätta antibiotika helt men om den utvärderas och används på rätt sätt kan den bidra till att antibiotikaförbrukningen kan minskas.

Sammanfattning

Lactobacillus reuteri har tidigare använts som probiotika i foder till smågrisar och kycklingar och även som tillsats i olika mejeriprodukter. Jag har i detta EEF-arbete visat att *L. reuteri* kan vara ett behandlingsalternativ vid vaginit bland avelsråttor. En besättning med ca 3000 avelsråttor hade drabbats av vaginala infektioner med β -hemolyserande streptokocker grupp G. Smittan spreds mellan djuren vid brunstkontroll med vaginal impedansmätning. Efter behandling med *L. reuteri* vaginalt och som tillsats i dricksvattnet har ingen växt av streptokockerna kunnat påvisas. Jag har även vid uppföljande *in vitro* försök visat att *L. reuteri* har en tillväxthämmande effekt på *Streptococcus canis* i flytande medium. Vidare hade *L. reuteri* förmågan att adherera till humana intestinalceller INT-407 *in vitro*.

Conclusion

Lactobacillus reuteri has been used as probiotics in piglet and chicken feedings as well as in different dairy products for humans. In this EEF-work I have shown that *L. reuteri* can be an alternative for treatment of vaginitis in laboratory rats used for breeding. In a breeding stock with 3000 animals some animals had a vaginal infection with β -haemolytic streptococci group G. The infection was spread among the animals when their heat statuses were checked intra vaginally with an impedance meter. After treatment with *L. reuteri* both intra vaginally and supplied in the drinking water no animal has been found to carry the infection. I have also shown by *in vitro* studies that *L. reuteri* has an inhibitory effect on growth of *Streptococcus canis* in liquid medium. Furthermore *L. reuteri* had the ability to adhere to human intestinal cells INT-407 *in vitro*.

Referenser

- Aiello, S E. 1998. *The Merck veterinary manual*. Eighth edition. National Publishing, In. Philadelphia, Pennsylvania. p 507.
- Axelsson, L. 1990. Lactobacillus reuteri, a member of the gut bacterial flora. *Swedish University of Agricultural Sciences, Department of Microbiology. Report 44*. ISSN 0348-4041
- Berger, I. 1998. Probiotika till hund – utopi eller verklighet?. *Svensk veterinär tidning*, vol 50, nr 12, 523-529
- Casas, Ivan, A. & Dobrogosz, Walter, J. 2000. Validation of the probiotic concept: Lactobacillus reuteri broad-spectrum protection against disease in humans and animals. *Microbial ecology in health and disease* 12, 247-285.
- Carter, G, R., Chengappa, M, M., & Roberts, A, W. 1995. *Essentials of veterinary Microbiology*. Fifth edition. Williams & Wilkins, Philadelphia. 232.
- Elmer, G W. 2001. Probiotics: "Living drugs". *American journal of health-system pharmacists* 58 (12), 1101-1109.
- Ettinger, S J. & Feldman E C. 2000. *Textbook of veterinary medicine diseases of the dog and cat fifth edition*. W B Saunders Company, Philadelphia, Pennsylvania. p 1567.
- Fuller, R.1992. *Probiotics: the scientific basis*. London, Chapman and Hall.
- Greene, Craig E. 1990. *Infectious diseases of the dog and cat*. W. B. Saunders Company, Philadelphia. p 600-605.
- Krovacek, Karel, 1996. *Aeromonas* spp. as foodborne pathogens. ISBN 91-576-5114-0
- Metchnikoff, E. 1908. *The prolongation of life*, G. P. Putnam's Sons, 1908:161
- Midtvedt, T & Norin, E. 1997. *Antibiotika & ekologi*. Wallin & Dalholm Boktr. AB, Lund. 7-20
- Molin, G., Johansson, M-L., Ståhl, M., Ahrné, S., Andersson, R., Jeppsson, B. & Bengmark, S. 1992. Systematics of the Lactobacillus population on rat intestinal mucosa with special reference to Lactobacillus reuteri. *Antonie von Leeuwenhoek* 6, 175-183.
- Osset, J., Bartolomé, R M., Garcia, E. & Andreu, A. 2001. Assessment of the capacity of Lactobacillus to inhibit the growth of uropathogens and block their adhesion to vaginal epithelial cells. *The Journal of infectious diseases* 183, 485-491.
- Ramos, S D., Lee, J M. & Peuler, J D. 2001. An inexpensive meter to measure differences in electrical resistance in the rat vagina during the ovarian cycle. *Journal of applacated physiology* 91,667-670.
- Reid, G. 2001. Probiotic agents to protect the urogenital tract against infection. *American Journal of Clinical Nutrition* 73, 437S-443S.
- Reid, G. & Bruce, A, W. 2003. Urogenital infections in women: can probiotics help?. *Postgrad medical Journal* 79, 428-432.
- Reid, G. & Bruce, A, W. 2001 Could probiotics be an option for treating and preventing urogenital infections? *Medscape General Medicine* 3(4).
- Rosenfeldt, V., Paerregaard, A., Nexmann Larsen, C., Lange Möller, P., Tvede, M., Sandström, B., Jakobsen, M. & Fleischer Michaelsen, K. 2003. Feecal recovery, mucosal adhesion, gastrointestinal effects and tolerance of mixed cultures of potential probiotic lactobacilli. *Microbial ecology in health and disease* 5, 2-9.
- Ström, E. 2000. Mucusbindning hos Lactobacillus reuteri och andra probiotiska lactobaciller. Examensarbete 2000:7. Sveriges lantbruksuniversitet, Institutionen för mikrobiologi. ISSN 1101-8151

Tack

Tack till mina handledare Dr. Karel Krovacek avdelningen för bakteriologi, SLU Uppsala och Prof. Tore Midtvedt MME, Karolinska Institutet, Stockholm, för all hjälp, engagemang och inspiration.

Tack även till Doc. Elisabeth Norin och lab. ass. Anna-Karin Persson på KI, Stockholm, lab-personal på Livsmedelshygien, SLU, Uppsala och Scanbur-B&K, Sollentuna.